

Aislamiento y cultivo de células madre posnatales de dientes primarios

Isolation and Culture of Postnatal Stem Cells from Deciduous Teeth

187

Univ Odontol. 2014 Ene-Jun; 33(70): 187-193. ISSN 0120-4319

CIENCIAS BÁSICAS, BIOTECNOLOGÍA Y BIOINFORMÁTICA

Daniela Oláñez

Odontóloga, profesora asistente, Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Siham Salmen

Médico, magíster en Ciencias, PhD, profesor titular, Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Karla Padrón

Odontóloga, profesora asistente, Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Carmine Lobo

Odontólogo, Cátedra de Ortodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Nancy Díaz

Odontóloga, magistra en Ciencias, PhD, Universidad Autónoma de Barcelona, España. Profesora titular, cátedra de Anatomía Humana, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Lisbeth Berrueta

Médica, magistra en Ciencias, PhD, profesora titular, Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Eduvigis Solórzano

Odontóloga, magistra en Ciencias, PhD, Universidad Autónoma de Barcelona, España. Profesora titular, cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

RESUMEN

Antecedentes: Las enfermedades degenerativas representan en la actualidad un problema de salud pública; de ahí que el desarrollo y aplicación de estrategias que permitan restituir parcial o totalmente los tejidos afectados tenga un especial interés en el campo biomédico. Una de las estrategias terapéuticas se basa en el uso de células madre estromales, en particular las provenientes de la pulpa dental. **Propósito:** Desarrollar un cultivo de células madre estromales a partir de pulpa dental de dientes primarios. **Métodos:** Se incluyó el aislamiento de células madre estromales de la pulpa dental de dos caninos deciduos extraídos con indicaciones terapéuticas y cultivo en medio D-MEM con SFB al 20 % a 37°C, y 5% CO₂, realizando cambios de medio de cultivo cada 3 días y observando cada 7 días. La confluencia del 80-90 % se logró luego de tres semanas. Se realizó la tinción con DAPI y STRO-1 y análisis mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia. **Resultados:** Los análisis muestran células adherentes purificadas con morfología fusiforme similar a fibroblastos y aparición de conglomerados semejantes a unidades formadoras de colonias (UFC). El total de la población mostró un 17 % de positividad al STRO-1, mientras que la población de mayor tamaño y más compleja mostró una positividad del 26 %. Asimismo, STRO-1 se localizó preferencialmente en las UFC. **Conclusiones:** Con el protocolo descrito se logró un cultivo de células madre estromales extraídas de pulpa dental en dientes primarios, como punto de partida para futuros ensayos terapéuticos y su aplicación en la regeneración tisular.

PALABRAS CLAVE

células cultivadas; células madre; diente primario

ÁREAS TEMÁTICAS

ingeniería de los tejidos; cultivo de células

ABSTRACT

Background: Currently, degenerative diseases represent a public health problem; therefore, the development and implementation of strategies to fully or partially recover of damaged tissues has a special interest in the biomedical field. Therapeutic strategies based on mesenchymal stem cells transplantation from dental pulp have been proposed as an alternative. **Purpose:** To develop a mesenchymal stem cells culture isolated from dental pulp of deciduous teeth. **Methods:** The mesenchymal stem cells isolation was performed from dental pulp of two deciduous canines, freshly extracted with therapeutic indication. Specimens were cultured in D-MEM medium with 20% FBS at 37 °C and 5% CO₂. The medium was changed every three days. 80-90% confluence was achieved after three weeks. Cells were stained with DAPI and STRO-1 and analyzed through flow cytometry and fluorescence microscopy. **Results:** The analysis showed that adherent cells had a fusiform fibroblast-like morphology and colony forming units (CFUs) were observed. 17% of the whole population was STRO-1+ and 26% of the larger and more complex population was positive to this antigen. Additionally, STRO-1+ cells were localized preferential in UFCs. **Conclusions:** The protocol described here could be used to enriching mesenchymal stem cells from dental pulp extracted from deciduous teeth and as a starting point for future therapeutic trials and their application in tissue regeneration.

KEYWORDS

cultured cells; stem cells; deciduous teeth

THEMATIC FIELDS

cell culture; tissue engineering

doi:10.11144/Javeriana.UO33-70.accm

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Oláñez D, Salmen S, Padrón K, Lobo C, Díaz N, Berrueta L, Solórzano E. Aislamiento y cultivo de células madre posnatales de dientes primarios. Univ Odontol. 2014 Ene-Jun; 33(70): 187-193. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.UO33-70.accm>

Recibido para publicación: 15/07/2013

Aceptado para publicación: 30/01/2014

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

INTRODUCCIÓN

Son muchos los esfuerzos que se han realizado en el ámbito científico para constatar el beneficio que las células madre pueden tener en los procedimientos de regeneración de tejidos lesionados, con el fin de aplicarlas en el tratamiento de patologías incurables. En el caso específico de las enfermedades degenerativas, usualmente asociadas con lesiones traumáticas, envejecimiento, defectos génicos e incluso estilos de vida, y que en la actualidad representan un problema de salud pública, la utilización de células madre ha generado esperanzas tanto en quienes se dedican a su manejo como en aquellos que la padecen. Gracias a los recientes avances tecnológicos de la biología molecular y celular, aunado a los nuevos enfoques terapéuticos de la medicina regenerativa y los procedimientos de bioingeniería tisular, han cambiado los protocolos de tratamiento para un número importante de entidades patológicas y han aumentado la esperanza de vida de muchas personas (1).

Una célula madre es aquella que aun no teniendo ninguna morfología de tejido específico, se renueva durante largos periodos por división celular (2). Al diferenciarse, puede desarrollar funciones especializadas que constituyen un enorme potencial terapéutico por sus aplicaciones en la regeneración de tejidos dañados y en el restablecimiento fisiológico. Las células madre son, por lo tanto, células indiferenciadas, inmaduras, autorrenovables y competentes para generar uno o más tipos de líneas celulares diferenciadas (3). Las células madre estromales o MSC (por su sigla en inglés *Mesenchymal Stem Cells* o *Mesenchymal Stromal Cells*) son células de tipo pluripotenciales que tienen la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células, tanto *in vivo* como *in vitro* y, desde el punto de vista embrionario, se originan de la capa germinal mesodérmica (4).

Así, las MSC aisladas de la pulpa dental (5-7) pueden, bajo diferentes condiciones, diferenciarse para formar tejido mineral equivalente a la dentina u otros tejidos mineralizados como hueso y cemento radicular. La gran capacidad de diferenciación y regeneración de estas células ha llamado la atención de muchos investigadores, ya que su obtención no genera ningún perjuicio al paciente donante (8), como es el caso de la pulpa sana de terceros molares incluidos o dientes primarios. El uso de estas fuentes de MSC posnatales respetan principios bioéticos de investigación y cuidado de la salud.

Las MSC posnatales provenientes de la pulpa dental se consideran actualmente las células de mayor plasticidad y capacidad reproductiva. Por ello, existe gran interés en aislarlas y caracterizarlas (9). Estas células son adherentes, fusiformes y morfológicamente similares a los fibroblastos y se caracterizan fenotípicamente por expresar cualquiera de los marcadores CD90, CD29, CD73, CD105, CD44 y STRO-1 (10,11).

El STRO-1 ha sido utilizado en varios estudios para identificar MSC *in vitro* de pulpa dental (12,13). Se describe como un antígeno de superficie que se expresa inicialmente con mayor intensidad en las unidades formadoras de colonias (UFC) o nichos (13) que, por lo general, se presenta en los pasajes iniciales. Incluso, se ha determinado que el STRO-1 se expresa en mayor proporción en cultivos de células de pulpa dental de dientes deciduos en presencia de UFC y su expresión disminuye en cultivos de varios pasajes (14).

Las MSC provenientes de la pulpa dental han mostrado la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y células neuronales (12), así como miocardiocitos (15). Ello indica su uso potencial en el tratamiento de diversas enfermedades degenerativas (12,16-18), tanto bucales como sistémicas. Sobre la base de lo expuesto, en este trabajo se muestra un protocolo para aislar y cultivar MSC posnatales a partir de pulpa dental de dientes deciduos para su uso potencial en terapias regenerativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio experimental se utilizó una muestra proveniente de tejido pulpar de dos caninos deciduos sanos con ápices cerrados, extraídos por razones ortodónticas a una paciente de 9 años de edad. Los especímenes se obtuvieron previa autorización por parte de la paciente y su acudiente por medio de la firma de un consentimiento informado, para lo cual se siguieron los lineamientos descritos en la Declaración de Helsinki de 2008. El trabajo de laboratorio para la obtención y cultivo de las células se basó en los protocolos de Magallanes y colaboradores (6) y Padrón y colaboradores (19), que se ajustaron para permitir su estandarización.

Obtención de la muestra y separación celular
Inmediatamente después de las exodoncias, los caninos se lavaron con solución fisiológica y se colo-

caron en un tubo estéril de 15 ml que contenía medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeco (D-MEM). Bajo cámara de flujo laminar y empleando una pieza de mano de baja velocidad y un disco con borde de diamante (20), se realizó un corte transversal a ± 2 mm del ápice, con la finalidad de acceder a los conductos radiculares y extraer en una sola intención los filetes pulpares completos por medio de una sonda barbada estéril N.º 20. Los filetes pulpares recién extraídos se colocaron en una caja de Petri estéril con medio D-MEM suplementado con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, vitaminas, penicilina y estreptomycin y enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 20 %. Se cortó luego el tejido en pequeñas porciones de aproximadamente 2 mm² con un bisturí hoja N.º 12 y se homogeneizó empleando el émbolo de una jeringa.

Acto seguido, se resuspendió el tejido en un tubo de 15 ml con medio D-MEM y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min a 4 °C, para luego descartar el sobrenadante y lograr la disgregación celular mediante el tratamiento con 2 ml de tripsina/EDTA durante 10 min a 37 °C. Luego de 3 lavados, las células se resuspendieron en D-MEM suplementado con SFB al 20 %. La viabilidad celular se determinó inmediatamente después de obtener el cultivo diluyendo la suspensión celular 1:100 con azul de tripán, y evaluadas mediante el uso de una cámara de Neubauer para contabilizar a través de la observación al microscopio de luz.

Cultivo celular

La suspensión celular se llevó a una placa de cultivo e incubación en estufa Nuair® a 37 °C con humedad relativa al 5 % de CO₂. Se realizaban cambios de medio cada 3 días para garantizar el crecimiento celular y se valoraban semanalmente la confluencia y la ausencia de contaminación bacteriana o fúngica por medio de microscopio de fase invertida. Pasadas 3 semanas, luego de alcanzar la confluencia de la placa de cultivo, se sembraron las células sobre láminas cubreobjetos previamente esterilizadas con luz ultravioleta, las cuales se colocaron en la placa con medio D-MEM y se llevaron nuevamente a la incubadora para su almacenamiento; esto, con el fin de hacer una evaluación mediante inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia

En la quinta semana de cultivo se realizó el marcaje celular por medio de un anticuerpo específico para MSC humanas acoplado a ficoeritrina (STRO-1-PE) (Santa Cruz Biotechnology) y 4',6-diamidino-2-phen-

ylindol (DAPI) (Molecular Probes). Para ello, las células crecidas en las laminillas cubreobjetos se fijaron con metanol a -20 °C durante 10 min, se lavaron una vez con solución amortiguadora de fosfato (PBS) y 3 veces con PBS gelatina, para luego incubarlas con anti-STRO-1-PE, diluido (1:10) en cámara húmeda durante 30 min en total oscuridad. Las células se lavaron 3 veces con PBS gelatina y se les agregó DAPI (1 µg/ml) para teñir los núcleos celulares. Se montaron las laminillas en presencia de glicerol, se sellaron y se observaron al microscopio de fluorescencia (Leica® modelo DMR). Las observaciones se documentaron y analizaron mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos).

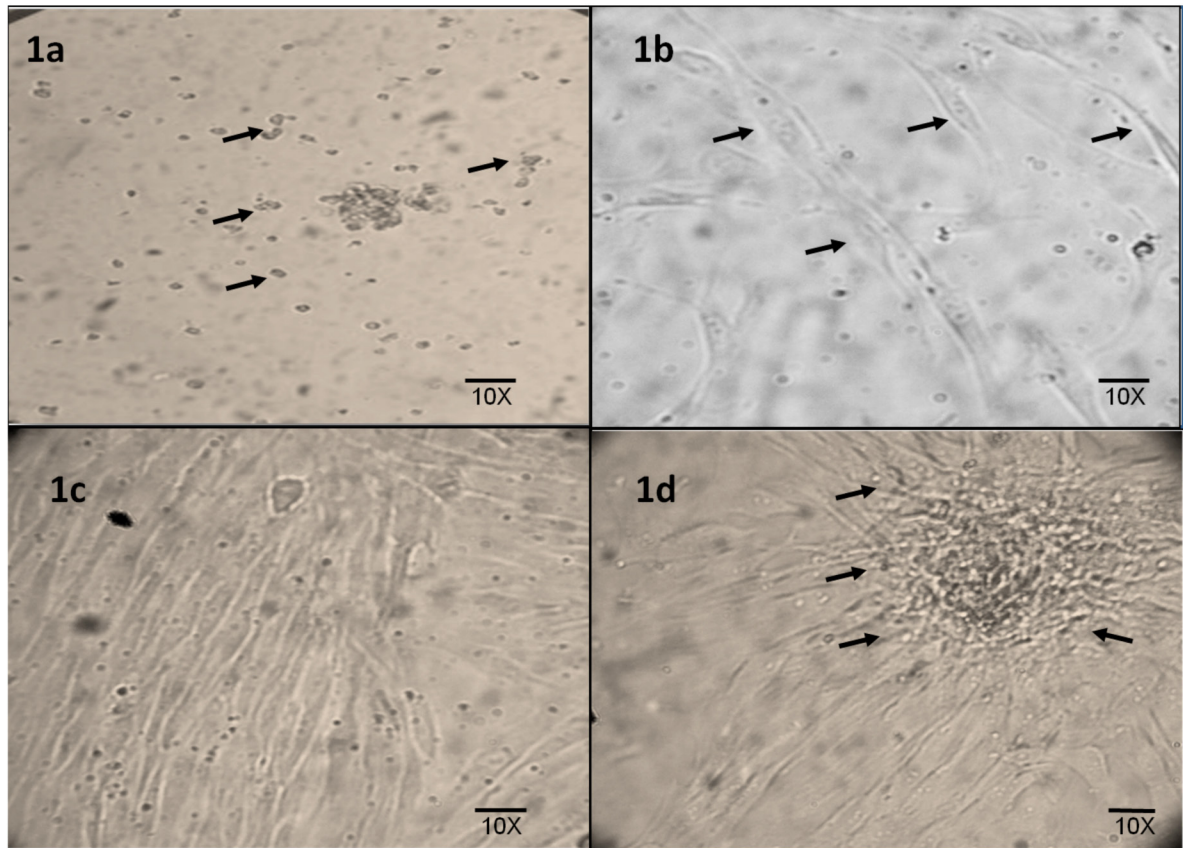
De igual manera, se evaluaron las MSC de acuerdo con su tamaño, complejidad de su estructura interna y porcentaje de expresión del antígeno STRO-1-PE, mediante citometría de flujo. Para ello se colocaron 500 × 10⁵ cel/ml de la suspensión celular en tres tubos estériles de 15 ml para fijarlo con paraformaldehído (PAF) al 3 % a temperatura ambiente durante 10 min. Acto seguido, se centrifugaron los tubos durante 5 min a 2000 rpm. Una de las muestras fue sometida a permeabilización, con el fin de detectar la expresión intra y extracelular, con saponina al 0,1 % por 20 min. Las muestras se centrifugaron y se marcaron con el anticuerpo monoclonal STRO-1-PE (1:10), se incubaron durante 30 min y se lavaron 3 veces. Se marcó un tercer tubo con isotipo de IgG como control negativo. Finalmente, las muestras se llevaron al citómetro FacSortBecton Dickinson® para su captura y análisis mediante el programa CellQuest (B&D, CA).

RESULTADOS

Los filetes pulpares aislados pasaron por proceso de disgregación enzimática para ser llevados a las placas de cultivo. La viabilidad celular, realizada mediante el ensayo con la coloración supravital con azul de tripán fue del 95 % y el conteo total de células aisladas fue de 5 × 10⁵ cel/ml. Las células fueron sembradas en un pozo de fondo plano de 75 cm² de superficie y se evaluaron mediante un microscopio óptico de fase invertida con una magnificación de 10X. En la figura 1a se evidencian elementos celulares aislados redondeados, con bordes irregulares y de pequeño tamaño al día 0 de cultivo. Posteriormente, a los 3 días de cultivo, se comenzaron a visualizar cambios morfológicos en los que se notaron elementos celulares fusiformes, alargados, mononucleados similares a fibroblastos (figura 1b). Luego de 14 días de incu-

FIGURA 1.

MICROFOTOGRAFÍA AL MICROSCOPIO ÓPTICO DE FASE INVERTIDA DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR.
 1a: ASPECTO INICIAL DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO DONDE SE OBSERVAN ELEMENTOS CELULARES REDONDEADOS (FLECHAS).
 1b: CULTIVO CELULAR DESPUÉS DE 3 DÍAS DONDE SE OBSERVAN CÉLULAS CON MORFOLOGÍA FUSIFORME (FLECHAS).
 1c: CULTIVO CELULAR DESPUÉS DE 14 DÍAS DONDE SE MUESTRAN LAS CÉLULAS DISTRIBUIDAS EN MONOCAPA.
 1d: CULTIVO CELULAR DESPUÉS DE 21 DÍAS DONDE SE EVIDENCIAN LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (FLECHAS)



bación, tiempo durante el cual se cambió el medio regularmente, fue posible separar células adherentes de las no adherentes y de esta manera se logró un cultivo en monocapa de células adherentes (figura 1c), que se hicieron 80 % confluentes a partir del día 21; en algunos campos también se evidenciaron cúmulos celulares semejantes a UFC (figura 1d).

Una vez alcanzada la confluencia del 80 %, se trataron las células con tripsina/EDTA, con el fin de sembrarlas en laminillas cubreobjeto y teñirlas en suspensión, para su análisis por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, respectivamente. Ambos análisis se realizaron a la quinta semana después de su purificación. Para ello, se utilizó el marcador específico STRO-1PE para evaluar el porcentaje de MSC positivas a este marcador presentes en cultivo. El análisis por citometría de flujo evidencia que el porcentaje del total de la población estudiada positiva a STRO-1 fue del 16,59 % para las células no permeabilizadas, y del

18 % para las permeabilizadas. Asimismo, se obtuvo una media de intensidad de fluorescencia (MIF) de 546 para las células no permeabilizadas y de 642 para las permeabilizadas (figuras 2a-2d). Se detectó, además, que una población de mayor tamaño y discretamente más compleja expresó mayor porcentaje de STRO-1 (26 %) (figuras 2e-2h).

En la figura 3 se observa la tinción y distribución del antígeno STRO-1. La figura 3a muestra el isotipo para STRO-1 como control negativo. Las figuras 3b y 3c ejemplifican las células marcadas con el anticuerpo STRO-1. Las figuras 3d y 3f muestran las células teñidas con DAPI y las figuras 3g y 3i evidencian, luego de realizar el solapamiento de los fluorocromos STRO-1 y DAPI, cómo las células positivas para STRO-1 se ubican preferencialmente cerca de los acúmulos celulares UFC.

FIGURA 2
ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

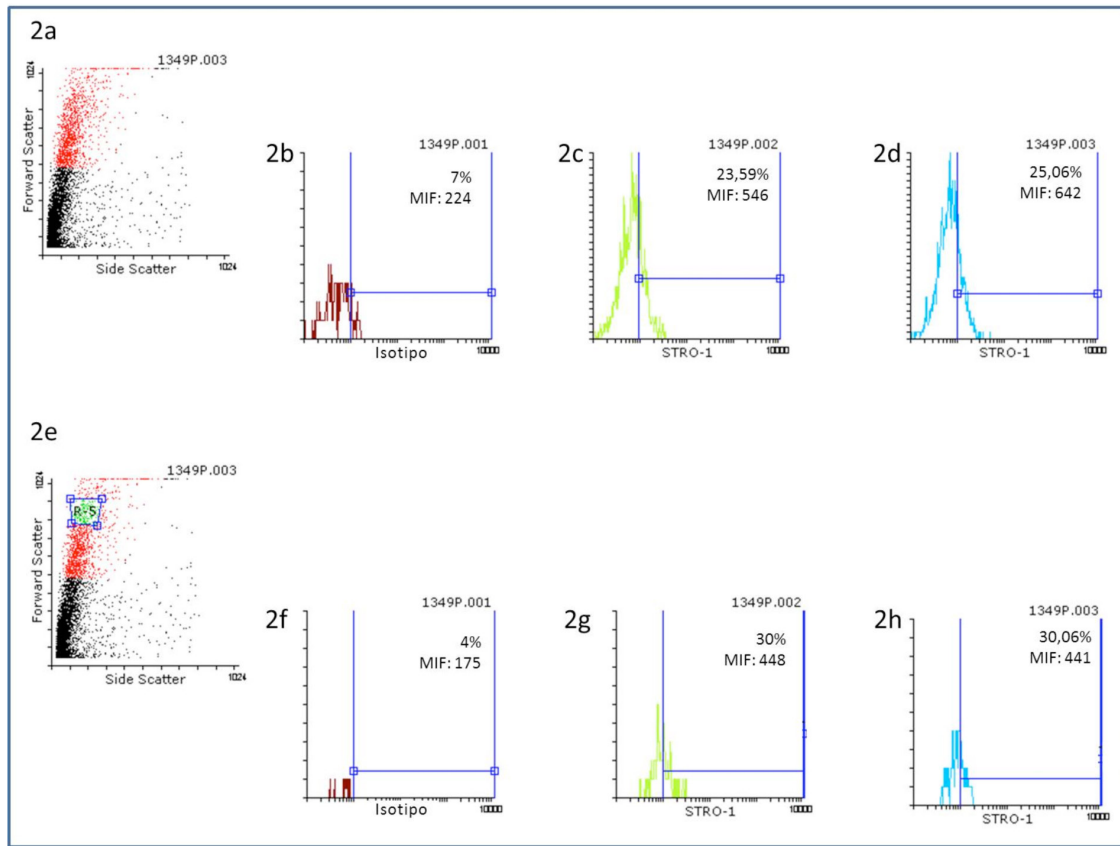
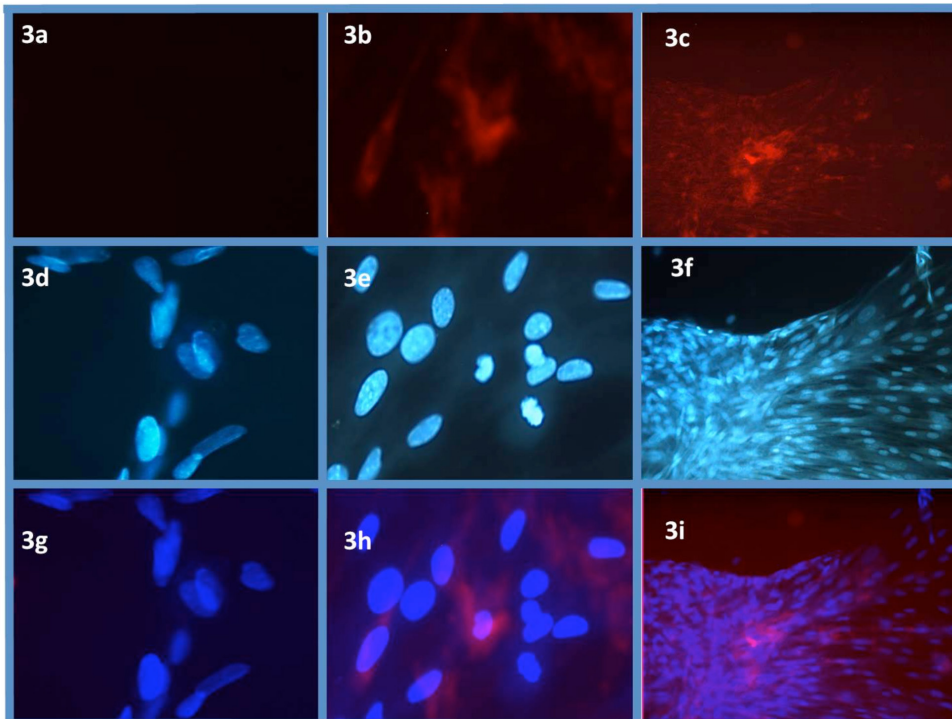


FIGURA 3
MICROFOTOGRAFÍA AL MICROSCOPIO ÓPTICO DE FLUORESCENCIA DE LA DISTRIBUCIÓN Y TINCIÓN DEL ANTÍGENO STRO-1 Y DAPI. 3a: ISOTIPO PARA STRO-1; 3b y 3c: CÉLULAS MARCADAS CON STRO-1. 3d-3f: CÉLULAS TEÑIDAS CON DAPI. 3g-3i: COLOCALIZACIÓN DE LOS 2 FLUOROCROMOS



DISCUSIÓN

El desarrollo de la medicina regenerativa enfocada en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, para el manejo de enfermedades degenerativas, ha contribuido al desarrollo de técnicas de biología celular dirigidas al cultivo *in vitro* de diferentes linajes celulares que preservan al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Ello tiene como finalidad estudiar los procesos intra y extracelulares, para su aplicación terapéutica. Por esto, es de gran interés para la comunidad científica obtener, cultivar y trasplantar MSC adultas (4), con el fin de que puedan diferenciarse con alta probabilidad de regenerar aquellas células o tejidos perdidos y sin los conflictos éticos que ha generado el uso de las células madre embrionarias.

Un tejido de interés odontológico rico en células madre estromales adultas es la pulpa dental. En la literatura se han definido diversos protocolos para su obtención y cultivos *in vitro*, a partir de tejido pulpar de terceros molares impactados y de dientes deciduos (2,12). Las células obtenidas de esta última fuente (dientes deciduos) son más accesibles, altamente proliferativas y fáciles de aislar y preservar (12). Además, debido a su origen embrionario de la cresta neural craneal, son capaces de expresar marcadores en su superficie que les permiten no solo diferenciarse en células de la pulpa dental, hueso y dentina, sino también en células musculares, nerviosas y adipocitos (5,21-23).

Por eso, en este trabajo se propuso obtener células indiferenciadas a partir de pulpa de dientes primarios sanos con indicación de extracción controlada con fines ortodónticos. Esta condición es considerada indispensable, ya que se requieren más de dos tercios de raíz para obtener suficiente tejido pulpar. En este sentido, se aplicó una técnica similar a la apicectomía para obtenerlo. Se cortaron 2 mm de la porción apical radicular con el uso de un disco de borde diamantado y una pieza de mano de baja velocidad y se introdujo una sonda barbada desde el ápice para extraer en una sola acción los filetes pulpare. Se evitaban así laceraciones y —quizás lo más importante— contaminación por parte del operador.

El protocolo de cultivo que se propone aquí se basó en los descritos anteriormente por otros autores (6,19) e incluye ciertas modificaciones que permitieron estandarizar un procedimiento sencillo y adaptado a las condiciones de infraestructura y económicas en las cuales se hace investigación en muchos países

latinoamericanos. Una de las modificaciones que se consideraron fue utilizar SFB al 20 %. En la literatura se puede observar como norma que con mayores concentraciones de SFB, hasta incluso al 50 %, se incrementa la eficiencia del crecimiento celular (23). No obstante, la mayoría de las células de la muestra, al utilizar SFB al 20 %, exhibieron una morfología similar a la de los fibroblastos con capacidad de proliferación y generaron pequeñas colonias o UFC, comportamiento que es similar a reportes previos que utilizan otras concentraciones del suero (24).

Las MSC expresan varios marcadores que las identifican. Dentro de ellos se destacan CD90, CD44 y STRO-1 (25). En el caso de STRO-1 (24,26,27), la literatura indica que está presente en las células frescas aisladas de la pulpa, pero también queda claro que se va perdiendo tras los pases a los que se someten estas células en cultivo *in vitro*. En este caso se utilizó el STRO-1, que se evidenció en aproximadamente el 20 % de la población, que se considera representativo y que es incluso mayor a lo reportado por otros autores (27). Asimismo, la distribución del marcador predominó en las áreas donde se observaron acúmulos celulares similares a UFC (13,14). Se ha comprobado que las células positivas de STRO-1 muestran una elevada capacidad de generar UFC (11), lo que apoya nuestros hallazgos.

CONCLUSIONES

El protocolo utilizado en este estudio mostró un cultivo *in vitro* de células confluentes y viables que expresan en su superficie el marcador de MSC STRO-1, de particular localización en las UFC generadas durante su crecimiento, obtenidas a partir de pulpa de dientes primarios sanos. Dadas las limitaciones expuestas en esta investigación (de infraestructura, económicas y disponibilidad para adquirir otros anticuerpos específicos), se sugiere reproducirlo utilizando otros marcadores de superficie.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, por el financiamiento otorgado bajo el código O-266-11-07-C.

REFERENCIAS

- Munévar JC, Becerra AP, Bermúdez C. Aspectos celulares y moleculares de las células madres involucrados en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica. *Acta Odontol Ven.* 2008; 46(3): 1-12.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec; 97(25): 13625-30.
- Arias ME, Felmer R. Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. *Arch Med Vet.* 2009; 41(3): 185-95.
- González-Andrade F, López-Pulles R. Células madre: definiciones y aproximación conceptual. *Rev Fac Cien Med.* 2009; 34: 64-70.
- Galli D, Benedetti L, Bongio M, Maliardi V, Silvani G, Ceccarelli G, Ronzoni F, Conte S, Benazzo F, Graziano A, Papaccio G, Sampaolesi M, De Angelis MG. In vitro osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells and human dental pulp stem cells on poly-L-lysine-treated titanium-6-aluminium-4-vanadium. *J Biomed Mater Res A.* 2011 May; 97(2): 118-26.
- Magallanes FM, Carmona B, Álvarez MA. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Rev Odontol Mex.* 2010; 14(1): 15-20.
- Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambará G, De Angelis L, Mancini M, Mitsiadis TA, Vivarelli E, Naro F, Filippini A, Papaccio G. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med.* 2010 Jun; 14(6B): 1635-44.
- Gómez ME, Campos A. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. 3ª ed. México: Panamericana; 2009.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009 Sep; 88(9): 792-806.
- Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, Caton J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Adv Dent Res.* 2011 Jul; 23(3): 275-9.
- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003 Apr; 18(4): 696-704.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May; 100(10): 5807-12.
- Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GT. Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *J Endod.* 2011 Sep; 37(9): 1217-24.
- Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z, Karbalaie K, Mousavi B, Talebi A, Nadali F, Tanhaei S, Kiyani G, Nematollahi M, Rabie F, Mardani M, Bahramiyan H, Torabinejad M, Hossein M, Esfahani N, Baharvand H. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int J Dev Biol.* 2011; 55(2): 189-95.
- Armiñán A, Gandía C, Bartual M, García-Verdugo JM, Lledó E, Mirabet V, Llop M, Barea J, Montero JA, Sepúlveda P. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2009 Jul-Aug; 18(6): 907-18.
- Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontol Res.* 2006 Dec; 41(6): 547-53.
- Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, Liu SY, Chen L, Ding Y, Xuan K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol.* 2012 Sep; 57(9): 1231-40.
- Zavan B, Bressan E, Sivoletta S, Brunello G, Gardin C, Nadia F, Ferroni L, Stellini E. Dental pulp stem cells and tissue engineering strategies for clinical application on odontoiatric field. In: Pignatello R, editor. *Biomaterials, science and engineering*, 1st edition. Rijeka, Croatia: Intech; 2011.
- Padrón K, Salmen S, Berrueta L, González E, Dávila L, Rojas J, Sosa L, Oláve D, Solórzano E. Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal. *Avan Biomed.* 2012 Ene-Jun; 1(1): 4-8.
- Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp.* 2012 Nov; (69): pii: 4372.
- Gandía C, Armiñán A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, Sánchez-Torrijos J, Payá R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA, Sepúlveda P. Huma7,5

CORRESPONDENCIA

Daniela Oláve
danielaolavez@ula.ve

Siham Salmen
salmensiham9@gmail.com

Karla Padrón
karla.padron@ula.ve

Carmine Lobo
carminelb@hotmail.com

Nancy Díaz
jabibe75@hotmail.com

Lisbeth Berrueta
lberruet@ula.ve

Eduvigis Solórzano
eduvigis@ula.ve

